

## *Verticillium albo-atrum* 菌体細胞壁成分に 対して高いペルオキシダーゼ活性を示す アルファルファ細胞系統の誘導と選抜

勝又 亨祥・小池 正徳・嶋田 徹 (帯広畜大)

Induction and selection of High Peroxydase cell lines of Alfalfa in response to *Verticillium albo-atrum* cell wall components

Yukiyoshi Katsumata, Masanori Koike and Tohru Shimada

(Obihiro Univ. Agric & Vet.Med.)

### 緒 言

ペルオキシダーゼ (PO) は、病害抵抗性反応でのスベリン化、リグニン化に深く関与する酵素として知られている<sup>1-5)</sup>。最近、Jones<sup>6)</sup>は、このような植物の動的抵抗性反応 (過敏感細胞死、フェニルアラニンアンモニリアーゼ (PAL) 活性、ファイトアレキシンの蓄積など) を選抜マーカーとして利用した新しい細胞選抜法の可能性を論じた。また、Koike と Shimada<sup>7)</sup> は、*Verticillium albo-atrum* 細胞壁成分を *Verticillium* 萎ちょう病の抵抗性程度の異なる遺伝子型の細胞系に処理した場合、抵抗性の細胞系において特異的に PO と PAL 活性が増加したと報告し、これらの酵素活性が細胞選抜のマーカー形質として利用できることを示唆した。

そこで、今回はアルファルファ・パーティシリウム萎ちょう病菌 (*Verticillium albo-atrum*) の細胞壁成分 (V a a CWC) 処理後、高い PO 活性を示すアルファルファ培養細胞系統を、選抜することを目的とした。

### 材料及び方法

#### 1. 供試植物

アルファルファ (*Medicago sativa* L.) のパーティシリウム萎ちょう病感受性個体 V 6 (品種バータス) を用いた。

#### 2. 組織培養

培養細胞は、V 6 の未展開葉を切除し、15分間、5%次亜塩素ナトリウムで表面殺菌し、殺菌水で3回洗浄後、SH寒天培地 (2, 4-D 2 mg/ml カイネチン 2 mg/ml, NAA 2 mg/ml、寒天 0.8%) 上に置床し、暗所25±1℃で誘導した。

誘導したカルスをSH液体培地に移植し、懸濁細胞を作出した。以後、14日ごとに新鮮SH液体培地に移植し、継代培養した。

#### 3. 突然変異処理

3~5回継代培養した増殖のよい懸濁細胞に突然変異誘発剤N-メチル-N'-ニトロソグアニシン (MNNG) を10 μg/ml, 20 μg/mlの濃度で、30分間30℃ 60 rpmで処理し、その後、新鮮SH液体培地で3回洗浄後、SH寒天培地にプレーティングし、暗所25±1℃で培養した。対照区として、殺菌水で同様の処理を施し

た。

#### 4. 細胞系統の維持

突然変異処理後、出現した1細胞コロニーを1培養細胞系統とし、4週間ごとに継代培養を繰り返し、各細胞系統を増殖させた。

#### 5. V a a C W C の抽出と V a a C W C 処理

V a a C W C の抽出は、*V. albo-atrum* 菌体から Biatti らの方法<sup>8)</sup>を修正し行った<sup>9)</sup>。

V a a C W C 処理は、7日間SH寒天培地上に置床した約300mgの培養細胞に、V a a C W C (グルコース当量 100 μg/ml)を30 μl処理し、20℃暗所で維持した。対照として、同量の殺菌水を処理した。

#### 6. P O 活性測定と選抜評価

V a a C W C 処理48時間後の培養細胞系統を、50mM Tris-HCl緩衝液(pH=8.8)でモジネートし、その後、遠心分離(12,000 rpm、3分間)を行い、上澄み液を粗酵素液とした。

粗酵素液100 μlを酵素活性測定試薬3ml(50mM Tris-HCl, 5mM p-オロメトキシフェノール、5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)中に加え、470nm1分間の吸光度の変化を分光光度計で測定した。

粗酵素液中のタンパク質含量は、Lowryらの方法により測定した<sup>10)</sup>。

P O 活性値は(1分間の吸光度の変化/タンパクmg)で示し、P O 比活性は(V a a C W C 処理後のP O 活性値/水処理後のP O 活性値)で示した。

また、各培養細胞系統のP O 活性測定は、3反復の平均で求め、選抜はレプリカ法を用いた。

#### 結果及び考察

突然変異処理後、260培養細胞系統を作出し

た。このうち、M N N G 無処理系統は、ランダムに120細胞系統を選びだし、M N N G 処理系統は生存した140細胞系統を作出した。この260細胞系統のうち、増殖のよい65細胞系統(M N N G 無処理29系統、処理36系統)を予備選抜し、P O 活性測定に用いた。

図1に65細胞系統の水処理48時間後のP O 活性値と、V a a C W C 処理48時間後のP O 活性値の頻度分布を示した。水処理後のP O 活性値の最大値は21.0であり、V a a C W C 処理後の最大値は45.3であった。また、65細胞系統の水処理後のP O 平均活性値3.97、V a a C W C 処理後では6.10であった。(Δ470/mgタンパク/min)

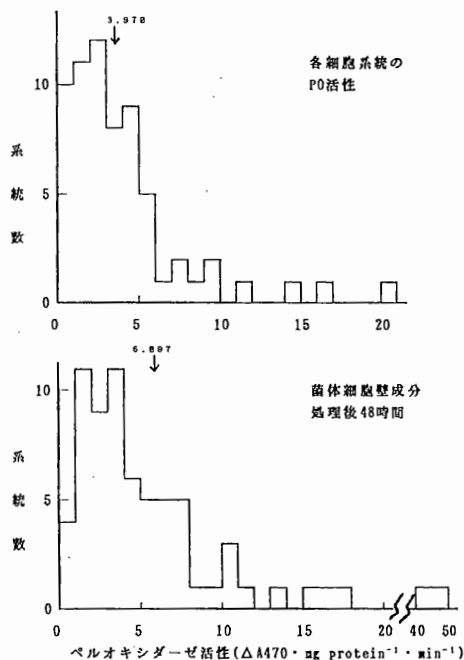


図1. 65細胞系統ペルオキシダーゼ活性頻度分布図

図2に65細胞系統のP O 比活性値の頻度分布を示した。比活性値の最小値は0.46、最大値は10.49を示し、幅広い変異が確認された。平均比活性値は1.73で、親株V 6比活性値0.79に比べ2.2倍高い平均比活性値を示した。

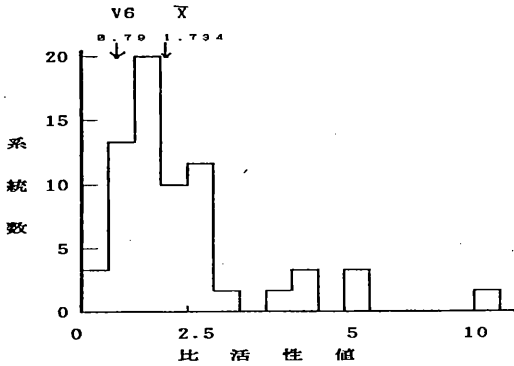


図2. PO比活性頻度分布

これらの65細胞系統から、まず2.5以上のPO比活性値を示す16細胞系統を選抜した。次にこれらの細胞系統から、更にV a a CWC処理後安定して高いPO活性を示す4細胞系統(20-7-36-V6, 20-7-46-V6, 10-35-V6, 10-37-V6)を選抜した(表1)。この4細胞系統の比活性値は、親株V6の2.7倍~4.6倍の値を示した。

表1. 4細胞系統の平均比活性値

細胞系統	比活性値
20-7-36-V6	2.64
20-7-46-V6	2.32
10-35-V6	3.64
10-37-V6	2.10
V6(親株)	0.79

突然変異誘発剤MNNGの効果は、全体の細胞数(65系統)は少ないが、得られた4細胞系統は全てMNNG処理系統であることから、有効に作用したものと考えられる。

すでに我々はV a a CWC処理後、高いPAL活性を示す培養細胞系統を選抜し、*in vitro*で病原菌に対して抵抗性反応を示すことを明らかにした<sup>11)</sup>。今後、今回得られた高いPO活性を示す4培養細胞系統の、菌生孢子処理後の過敏感細胞死などの種々の病害抵抗性反応をさらに検討し、もし、この4細胞系統が抵抗性反応を示すの

であれば、V a a CWC処理後のPO活性を選抜マーカーとした、パーティシリウム萎ちょう病抵抗性細胞の選抜に有効な手段の一つとなりうるだろう。また今回は、可溶性PO活性のみしか測定を行わなかったが、動的抵抗性反応において、可溶性POだけでなく、イオン結合性POや膜結合性PO活性の増加も認められるため<sup>1-5, 12-16)</sup>、これら結合性POについての解析も検討して行きたい。

Summary

To obtain alfalfa cell lines with high peroxidase (PO) activity in response to heat - release cell wall components (elicitor) of an alfalfa pathogen (*Verticillium albo-atrum*), the selection using a replica plating method was carried out on 65 cell lines derived from suspension cultures treated with N - methyl - N' - nitrosoguanidine (MNNG) of the susceptible genotype of cv. Vertus. Four stable high PO cell lines in response to elicitor were isolated through screening procedures.

引用文献

- 1) Michael H. Walter (1992) In "Genes Involved in Plant Defence" pp 326 - 346
- 2) Vidhyasekaran. P, (1988) In "Physiology of Disease Resistance in Plants, vol 1" pp 121 - 135; Boca Raton CRC
- 3) Vidhyasekaran. P, (1988) In "Physiology of Disease Resistance in Plants, vol 2" pp 5 - 16; Boca Raton CRC

- 4) Street. P. F. S, J. Robb, B. E. Ellis (1986) *Protoplasma*, 132 ; 1 - 11
- 5) Mohan. R, P. E. Kolattukudy (1990) *Plant Physiol*, 92 ; 276 - 280
- 6) Jones, P. W. (1990) In "Plant Cell Line Selection" (ed. by Dix P. J) p. 113 - 149, VHC, Weinheim.
- 7) Koike. M and T. Shimada, (1992) *Plant Tissue Culture Lett*, 9 (2) ; 81-85
- 8) Buiatti. M, A. Scala, P. Bettini, R. Morpurogo, P. Bogani, G. Pellegrini, F. Gimelli and R. Venturo (1985) *Theor. Appl. Genet.* 70, 42-47
- 9) Koike. M, K. Nanbu, T. Shimada, (1992) *J. Japan. Grassl. Sci*, 37 (4) ; 412 - 419
- 10) Lowry. O. H, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, (1951) *J. Biol. Chem.*, 193 ; 265 - 275
- 11) Koike. M, Y. Katsumata, Y. Amemiya and T. Shimada (Submitted)
- 12) Reimers. P. J, A. Guo and J. E. Leach (1992) *Plant Physiol*, 99 ; 1044-1050
- 13) Moerschbacher. B. M, U. M. Noll, B. E. Flott and H. J. Reisener (1988) *Physiol Mol Plant Pathol*, 33 ; 33-46
- 14) Storti. E, C. Latil, P. Bogani, M. G. Pellegrini (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84 ; 123 - 128
- 15) Gross. G. G, (1980), *The Biochemistry of Lignification. Adv Bot Res* 8 ; 25-63
- 16) Hammerschmidt. R, E. M. Nuckles and J. Kuc (1982) *Physiol Pathol*, 20 ; 73 - 82